

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 30 NOV. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 03  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

03 540 011 / 210502

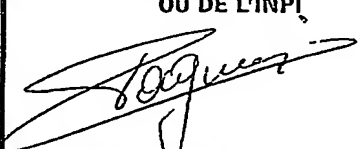
<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>19 NOV 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS 34 SP</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0313555</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>19 NOV. 2003</b>		<b>1</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet ARMENGAUD AINE 3, Avenue Bugeaud 75116 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) CP 61158-1820			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2</b> NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
<b>3</b> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) "NOUVEAUX MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES"			
<b>4</b> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5</b> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT DE LA RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (I.R.D.)	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège		213, Rue de Lafayette	
Rue			
Code postal et ville		75116 PARIS CEDEX 10	
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

BEST AVAILABLE COPY

REMISE DES PIÈCES  
DATE **19 NOV 2003**  
LIEU **75 INPI PARIS 34 SP**  
N° D'ENREGISTREMENT **0313555**  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		
Nom		PEAUCELLE
Prénom		Chantal
Cabinet ou Société		Cabinet ARMENGAUD AINE
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		92-1189
Adresse	Rue	3, Avenue Bugeaud
	Code postal et ville	75 011 16 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01-45-53-05-50
N° de télécopie (facultatif)		01-45-53-80-21
Adresse électronique (facultatif)		armengau@club-internet.fr
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques.
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Mandataire : Chantal PEAUCELLE 92-1189 Paris, le 19 novembre 2003		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 

Nouveaux moyens pour la prévention des *leishmanioses*

5 L'invention a pour objet de nouveaux moyens pour la prévention des *leishmanioses* chez l'animal et chez l'homme.

Elle vise en particulier des molécules d'acides nucléiques codant pour des facteurs de virulence ou de pathogénicité chez *Leishmania* et leur utilisation pour produire de tels facteurs afin d'élaborer des compositions vaccinales contre les *leishmanioses*.

10 Les *leishmanioses* représentent l'une des six maladies parasitaires majeures et sont considérées, à ce titre, comme prioritaires par l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S). Les leishmanies existent sous la forme promastigote extracellulaire, à l'intérieur du tube digestif de l'insecte vecteur (le phlébotome), et sous la forme amastigote intracellulaire, chez l'hôte mammifère. Plusieurs molécules, dont les  
15 lypophosphoglycanes (LPG) ou une métalloprotéase appelée gp63, semblent jouer un rôle important dans le pouvoir infectieux et la pathogénicité du parasite. Plus récemment, une famille de glycoprotéines appelées antigènes de surface de promastigotes, PSA (pour "Promastigote Surface Antigens"), a suscité un intérêt nouveau. Ces PSA sont caractérisées par la présence de motifs répétés riches en  
20 leucine pouvant intervenir dans les interactions de type protéine/protéine et confèrent une immunité protectrice à médiation cellulaire de type Th 1 chez la souris. Chez des organismes, tels que les bactéries ou les plantes, il est apparu que les PSA étaient impliquées dans des fonctions comme l'adhésion cellulaire, la résistance aux pathogènes et la transduction de signaux.

25 Cependant, aucun rôle biologique n'a été décrit, ni suggéré, chez *Leishmania*.

Ce rôle a pu être étudié par les inventeurs grâce à la technique qu'ils détiennent pour cultiver des promastigotes et des amastigotes de *Leishmania* dans des conditions asériques et axéniques, avec un milieu totalement défini, c-à-d dont les constituants sont tous identifiés, et qui fait l'objet du brevet FR 93 05 779 du 13 mai 1993 au nom  
30 de l'IRD (ex. ORSTOM). La maîtrise de ce procédé leur permet de disposer de formes parasitaires dépourvues des contaminants apportés jusqu'alors par les

milieux de culture, et de déterminants antigéniques sous une forme hautement purifiée.

Dans ledit brevet FR de la Demanderesse, on a déjà décrit l'isolement et l'identification d'une PSA excrétée/secrétée (antigène d'excrétion/secrétion ou AES en abrégé) de 38 kDa et de 45 kDa dans le surnageant de culture de *L. amazoniensis*.

Les inventeurs ont à présent isolé et cloné l'ADNc codant pour cette protéine et procédé à l'évaluation de son rôle dans la biologie du parasite en mettant au point une stratégie de transgénèse additionnelle. Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'implication de cette PSA en tant que facteur de virulence et/ou de pathogénicité et d'élaborer des constructions permettant de surexprimer le gène de *Leishmania* codant pour cette PSA, ce qui permet de développer des moyens pour l'obtention de compositions vaccinales contre les *leishmanioses*.

L'invention a donc pour but de fournir des séquences d'acides nucléiques capables de coder pour des PSA de formes promastigotes et de formes amastigotes de *Leishmania*, constituant des facteurs de virulence et/ou de pathogénicité.

Elle vise tout particulièrement à fournir des vecteurs de surexpression de ces PSA, ainsi que des parasites génétiquement modifiés.

L'invention vise en outre les surnageants des milieux de culture des PSA obtenues, ainsi que les PSA isolées, purifiées, et la mise à profit de leurs propriétés pour élaborer des compositions vaccinales contre les *leishmanioses*.

Les séquences d'acides nucléiques de l'invention correspondent à des acides nucléiques isolés capables de coder pour une PSA de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania*, lesdits acides nucléiques répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.

Les séquences d'acides nucléiques de l'invention sont plus spécialement des séquences de clones d'ADNc appartenant à une famille répondant aux caractéristiques illustrées par la figure 2 et comprenant en particulier un site de restriction *Sall* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.

L'invention vise en particulier les clones d'ADNc de ladite famille comportant un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *SalI* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *SalI*.

5 L'invention vise également les protéines immunogènes isolées, caractérisées en ce qu'elles présentent une séquence telle que codée par les acides nucléiques définis ci-dessus.

Ces protéines appartiennent à la famille dite des antigènes de surface de promastigotes (PSA en abrégé) et possèdent des régions caractéristiques illustrées sur les figures 3A et 3B. Ces protéines peuvent être modifiées post-  
10 traductionnellement par des N-glycosylations, phosphorylations et l'ancrage d'un GPI. Elles possèdent un peptide signal hydrophobe en position carboxy-terminale.

Par clonage directionnel des séquences définies ci-dessus dans un vecteur d'expression, les inventeurs ont obtenu des constructions permettant de les exprimer en position sens.

15 L'invention vise donc des constructions d'acides nucléiques, caractérisées en ce qu'elles comportent des acides nucléiques isolés en position sens, capables de coder pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania* répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.

20 L'invention vise notamment les constructions d'acides nucléiques comportant des séquences de clones d'ADNc appartenant à une famille répondant aux caractéristiques illustrées par la figure 2 et comprenant en particulier un site de restriction *SalI* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.

25 Les clones d'ADNc comportant un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *SalI* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *SalI* sont particulièrement préférés. Des constructions particulièrement avantageuses comportent comme séquences d'acides nucléiques, une séquence choisie parmi SEQ ID N°6 à SEQ ID N°10.

Des constructions préférées comportent lesdites séquences d'acides nucléiques dans  
30 un plasmide à multiplication rapide tel que pTex.

L'invention vise en particulier les clones d'ADNc de ladite famille comportant un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *SalI* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *SalI*.

L'invention vise également les protéines immunogènes isolées, caractérisées en ce qu'elles présentent une séquence telle que codée par les acides nucléiques définis ci-dessus.

Ces protéines appartiennent à la famille dite des antigènes de surface de promastigotes (PSA en abrégé) et possèdent des régions caractéristiques illustrées sur les figures 3A et 3B. Ces protéines peuvent être modifiées post-traductionnellement par des N-glycosylations, phosphorylations et l'ancrage d'un GPI. Elles possèdent un peptide signal hydrophobe en position carboxy-terminale.

Par clonage directionnel des séquences définies ci-dessus dans un vecteur d'expression, les inventeurs ont obtenu des constructions permettant de les exprimer en position sens.

L'invention vise donc des constructions d'acides nucléiques, caractérisées en ce qu'elles comportent des acides nucléiques isolés en position sens, capables de coder pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania* répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.

L'invention vise notamment les constructions d'acides nucléiques comportant des séquences de clones d'ADNc appartenant à une famille répondant aux caractéristiques illustrées par la figure 2 et comprenant en particulier un site de restriction *SalI* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.

Les clones d'ADNc comportant un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *SalI* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *SalI* sont particulièrement préférés.

Des constructions particulièrement avantageuses comportent comme séquences d'acides nucléiques, une séquence choisie parmi SEQ ID N°1 à SEQ ID N°5.

Des constructions préférées comportent lesdites séquences d'acides nucléiques dans un plasmide à multiplication rapide tel que pTex.

Elle vise également les souches de *Leishmania* transfectées par de telles constructions qu'il s'agisse de formes promastigotes, ou de formes amastigotes.

Des souches transfectées préférées, compte tenu des applications vaccinales visées, sont des souches de *L.infantum*.

- 5 De manière avantageuse les PSA sont produites en grande quantité, de manière constitutive, dans les parasites.

L'invention vise également un procédé de transfection d'un parasite de *Leishmania*, caractérisé en ce qu'on introduit dans le parasite de *Leishmania* un vecteur tel que défini plus haut, comportant un marqueur, on sélectionne les parasites transfectés  
10 grâce audit marqueur, on les met en culture dans un milieu axénique et asérique totalement défini et on récupère le surnageant de culture qui renferme les protéines immunogènes présentes dans des concentrations de l'ordre de 10 à 20 fois supérieures à celle produite par la souche mère de *Leishmania*.

L'introduction du vecteur dans le parasite est par exemple réalisée par  
15 électroporation.

L'insertion de ces acides nucléiques dans les parasites permet d'augmenter le pouvoir infectieux de ces derniers : leur capacité à survivre dans le macrophage infecté et à s'y multiplier est supérieure jusqu'à 5 fois celle du parasite non transfecté par de tels acides nucléiques.

- 20 Lesdites PSA sont produites en grande quantité dans le surnageant du milieu de culture des parasites. L'invention vise donc également les surnageants des milieux de cultures desdits parasites génétiquement modifiés, ainsi que les PSA isolées à partir de ces surnageants et purifiées.

L'invention fournit ainsi des moyens de grand intérêt pour répondre à la demande  
25 industrielle de disposer de quantités importantes de protéines constituant des facteurs de virulence/pathogénicité chez les *Leishmanies*.

Grâce à leur pouvoir immunogène, ces protéines permettent d'obtenir, après immunisation d'animaux selon des techniques classiques, des anticorps polyclonaux et d'élaborer des anticorps monoclonaux. L'immunisation de souris a ainsi permis  
30 d'obtenir des anticorps anti Ig G2A et celle de chien des anticorps IgG2.



L'invention vise donc également de tels anticorps et mise à profit de leurs propriétés pour élaborer à une échelle exportable industriellement des compositions vaccinales contre les *leishmanies* chez l'homme ou animal.

Les applications diagnostiques de ces anticorps font également partie de l'invention.

5 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront donnés dans les exemples qui suivent dans lesquels il sera fait référence aux figures 1 à 6 , qui représentent, respectivement :

- la figure 1, l'alignement en 3' des séquences nucléotidiques de clones d'ADNc selon l'invention ;

10 - la figure 2, un schéma récapitulatif des séquences nucléotidiques des clones d'ADNc obtenus après criblage immunologique par un anticorps monoclonal anti-AES des banques d'expression des formes promastigotes et des formes amastigotes de *L. amazonensis*. Les sites des enzymes de restriction sont indiqués au-dessus de chaque séquence ;

15 - la figure 3A, la localisation de différentes régions protéiques, caractérisées par leur composition particulière en acides aminés, présentes sur la séquence protéique déduite de l'ADNc du clone A3B, et la figure 3B une représentation schématique de la séquence protéique déduite de l'ADNc du clone A3B codant pour une PSA ;

- la figure 4, les analyses des transcrits par RT-PCR chez les formes promastigotes (P) et amastigotes (A) ;

- la figure 5, le niveau de production de la protéine par western-blotting, à l'aide d'un anticorps anti-PSA, et

- la figure 6, l'effet de la surexpression d'une PSA de *L. amazonensis* sur le pouvoir infectieux des parasites.

25

# 1 - Caractérisation moléculaire des immunogènes majeurs des AES des formes promastigotes et amastigotes de *L. amazonensis*. (Lma en abrégé)

Cette caractérisation a été effectuée en criblant des banques d'expression d'ADNc des formes promastigotes et des formes amastigotes de *L. amazonensis* à l'aide d'un

30 anticorps monoclonal dirigé contre l'immunogène majeur des AES.

## - Caractéristiques des banques d'ADNc :

Deux banques d'expression d'ADNc, respectivement de formes promastigotes, et de formes amastigotes de *L. amazonensis* ont été réalisées. Les caractéristiques de ces banques sont présentées au tableau I. Les parasites de phase exponentielle et stationnaire ont été mélangés afin d'avoir accès aux différents transcrits pouvant être exprimés au cours des différentes étapes de leur culture *in vitro*.  $5 \times 10^4$  phages par banque ont ensuite été criblés immunologiquement avec l'anticorps monoclonal F5 dilué au 1/500<sup>ème</sup>. L'obtention de cet anticorps fait l'objet de l'exemple dans le brevet FR mentionné ci-dessus.

Tableau I

Banque d'ADNc Lma LES J4 + J7	Promastigotes	Amastigotes
récoltes J4 + J7	$7,8.10^9$	$7,8.10^9$
Titration après packaging	350 000	500 000
Titre après amplification	$8,32.10^7$ ph/ul	$2,16.10^8$ ph/ul

J4 + J7 = parasites récoltés au 4<sup>ème</sup> jour, en phase exponentielle, et au 7<sup>ème</sup> jour, en phase stationnaire de leur croissance.

- Isolement et séquençage des clones reconnus par l'anticorps monoclonal F5

13 clones de la banque promastigote et 11 clones de la banque amastigote se sont révélés positifs. Tous ces clones ont été isolés par criblage secondaire et tertiaire.

L'ADN plasmidique de l'ensemble des clones isolés a été analysé après différentes digestions enzymatiques et les ADNc possédant des inserts de plus grande taille, par digestion *EcoRI/XhoI*, ont été retenus afin d'éliminer les ADNc trop tronqués en 5'.

Comme le montre le tableau II, les clones 1A1, 1B1, 2B3, 2C1, 2D1 et 2E1 de la banque d'ADNc de promastigotes et les clones A3B, V4A, V5, W2 et W3 de la banque d'amastigotes présentent les inserts de plus grande taille.

L'analyse de ces clones, en déterminant la présence ou non de deux sites d'enzymes de restriction (*HindIII* et *SalI*) préalablement sélectionnés, a montré qu'ils présentaient une forte homologie de leur séquence nucléotidique.

5 particulières de leur ADN (la taille de l'insert et la localisation de certains sites  
d'enzyme de restriction) sont représentés en caractère gras dans le tableau II.

### Tableau II

Banque d'ADNc de promastigotes de *Lma*

Clones ADNc	1A1	1B1	1C1	1D5	1F1	2A2	2B3	2C1	2D1	2E1	2F1	2G1	B3 A
Taille des inserts EcoRI/XhoI (kb)	2,5	2,5	2-2,2	0,5	2	2(>)	2,5	2,4	2,4	2,4	2	1,7-2	1,7
Carte de restriction													
<i>SalI</i>	O	O	O	N	N	N	O	O	O	O	N	O	N
<i>HindIII</i>	1,1	1,1	1,1	/	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
<i>HindIII/SalI</i> (pb)	600	600	500	N	N	N	600	500	500	500	N	<400	N
Expression de protéine recombinant e													
(kDa)	45	/	40	/	/	/	/	42,5	/	/	39	?	18

10 Banque d'ADNc amastigotes de *Lma*

[illegible]

EcoRI/XhoI (kb)	2,3	2-2,2	2,2	?	2,3	2,3	2	2	2,3	2,2	1,7
Carte de restriction											
<i>SalI</i>	O	O	O	N	O	O	N	N	O	O	N
<i>HindIII</i>	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
<i>HindIII/SalI</i> (pb)	505	500	500	N	500	500	N	N	600	500<	N
Expression de protéine recombinante											
(kDa)	42,5	/	36,5	/	36,5	43	/	/	45	/	/

O= oui, pour site présent ; N= non, pour site absent ; / = réalisé ; ? = résultat non obtenu.

Le tableau II donne également les résultats relatifs à la capacité des clones à exprimer une protéine recombinante. L'IPTG a été utilisé comme agent d'induction. Les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE et immunoblot en présence de l'anticorps anti-AES des formes promastigotes et/ou des formes amastigotes, préalablement absorbé en présence de lysat de *E. coli*. On obtient des résultats équivalents. On note pour les clones d'intérêt l'expression de différentes protéines recombinantes allant de 42,5 kDa de poids moléculaire apparent (clone 2C1), à 43 kDa (clone A3B) ou 45 kDa (1A1 et W2).

On rapporte sur le document "Listage des séquences", les résultats du séquençage :

- des trois types de clones suivants de la banque promastigote :

- . le clone de type 1A1 (SEQ ID N°8), qui exprime une protéine de plus grand poids moléculaire. Les clones de type 1B1 et 2B3 sont du même type que ce clone ;
- . le clone 2C1 (SEQ ID N°2), qui exprime une protéine recombinante de poids moléculaire inférieur à celle du clone 1A1 ;
- . le clone 2G1 (SEQ ID N°9), qui a la particularité de posséder un petit fragment *HindIII/SalI* ;

EcoRI/XhoI (kb)	2,3	2-2,2	2,2	?	2,3	2,3	2	2	2,3	2,2	1,7
Carte de restriction											
<i>Sall</i>	O	O	O	N	O	O	N	N	O	O	N
<i>HindIII</i>	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
<i>HindIII/Sall</i> (pb)	505	500	500	N	500	500	N	N	600	500<	N
Expression de protéine recombinante											
(kDa)	42,5	/	36,5	/	36,5	43	/	/	45	/	/

O= oui, pour site présent ; N= non, pour site absent ; / = réalisé ; ? = résultat non obtenu.

Le tableau II donne également les résultats relatifs à la capacité des clones à exprimer une protéine recombinante. L'IPTG a été utilisé comme agent d'induction. Les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE et immunoblot en présence de l'anticorps anti-AES des formes promastigotes et/ou des formes amastigotes, préalablement absorbé en présence de lysat de *E. coli*. On obtient des résultats équivalents. On note pour les clones d'intérêt l'expression de différentes protéines recombinantes allant de 42,5 kDa de poids moléculaire apparent (clone 2C1), à 43 kDa (clone A3B) ou 45 kDa (1A1 et W2).

On rapporte sur le document "Listage des séquences", les résultats du séquençage :

- des trois types de clones suivants de la banque promastigote :

le clone de type 1A1, qui exprime une protéine de plus grand poids moléculaire. Les clones de type 1B1 et 2B3 sont du même type que ce clone ;

le clone 2C1 (SEQ-ID N°2), qui exprime une protéine recombinante de poids moléculaire inférieur à celle du clone 1A1 ;

le clone 2G1, qui a la particularité de posséder un petit fragment *HindIII/Sall* ;

- des deux clones suivants de la banque amastigote :

- des deux clones suivants de la banque amastigote :

. les clones de type A3B (SEQ ID N°6), qui expriment une protéine recombinante d'environ 43 kDa et possèdent un fragment *HindIII/SalI* de 500 pb, le clone V5 apparaissant identique. Les clones V2D et V4A sont considérés comme des clones

5 tronqués du même type ;

. le clone W2 (SEQ ID N°10), qui exprime une protéine recombinante de 45 kDa et qui présente un fragment *HindIII/SalI* de 600 pb.

#### . Etude des cinq séquences d'ADNc

10

L'alignement des cinq séquences d'ADNc obtenues est représenté à la figure 1 où les différences entre ces clones sont seulement dues à la présence d'une séquence tronquée en 5' et/ou l'insertion de séquences d'environ 72 nucléotides du côté 5'. Les clones présentent ainsi une (clones 2C1 et A3B) ou trois (clones 1A1 et W2) insertions.

15 Hormis ces zones d'insertions, les clones présentent des homologies de l'ordre de 99% et peuvent être considérés comme appartenant à une famille d'ADNc. Seul le clone A3B possède le codon ATG d'initiation, les autres clones étant tronqués en 5'. Cependant l'ADNc A3B ne possède pas la séquence de 39 nt codant pour le "splice leader" retrouvée en 5' sur tous les ARNm de *Leishmania*.

20 Les ADNc des clones A3B et 2C1 présentent une homologie quasi totale et sont donc considérés comme identiques, l'ADNc du clone 2C1 correspondant à une partie tronquée en 5' de l'ADNc du clone A3B.

Le clone A3B, représentatif de cette famille a fait l'objet d'un séquençage entier dans les deux sens.

25 On a rapporté sur la figure 2 les sites des enzymes de restrictions pour chacun de ces clones.

Les séquences SEQ ID N°6 à 10, correspondent respectivement à celles des ADNc de A3B, 2C1, 1A1, 2G1, W2.

#### - Analyse des différentes séquences protéiques déduites

30 La traduction des différentes séquences d'ADNc en séquences protéiques a été réalisée en choisissant le cadre de lecture correspondant à celui suggéré par la

- . les clones de type A3B, qui expriment une protéine recombinante d'environ 43 kDa et possèdent un fragment *HindIII/SalI* de 500 pb, le clone V5 apparaissant identique. Les clones V2D et V4A sont considérés comme des clones tronqués du même type ;
  - . le clone W2, qui exprime une protéine recombinante de 45 kDa et qui présente un
- 5 fragment *HindIII/SalI* de 600 pb.

#### . Etude des cinq séquences d'ADNc

- 10 L'alignement des cinq séquences d'ADNc obtenues est représenté à la figure 1 où les différences entre ces clones sont seulement dues à la présence d'une séquence tronquée en 5' et/ou l'insertion de séquences d'environ 72 nucléotides du côté 5'. Les clones présentent ainsi une (clones 2C1 et A3B) ou trois (clones 1A1 et W2) insertions. Hormis ces zones d'insertions, les clones présentent des homologies de l'ordre de 99% et peuvent être considérés comme appartenant à une famille d'ADNc. Seul le
- 15 clone A3B possède le codon ATG d'initiation, les autres clones étant tronqués en 5'. Cependant l'ADNc A3B ne possède pas la séquence de 39 nt codant pour le "splice leader" retrouvée en 5' sur tous les ARNm de *Leishmania*.

- Les ADNc des clones A3B et 2C1 présentent une homologie quasi totale et sont donc considérés comme identiques, l'ADNc du clone 2C1 correspondant à une partie
- 20 tronquée en 5' de l'ADNc du clone A3B.

Le clone A3B, représentatif de cette famille a fait l'objet d'un séquençage entier dans les deux sens.

On a rapporté sur la figure 2 les sites des enzymes de restrictions pour chacun de ces clones.

- 25 Les séquences SEQ ID N°1 à 5, correspondent respectivement à celles des ADNc de A3B, 2C1, 1A1, 2G1, W2.

#### - Analyse des différentes séquences protéiques déduites

La traduction des différentes séquences d'ADNc en séquences protéiques a été réalisée en choisissant le cadre de lecture correspondant à celui suggéré par la

position du codon d'initiation sur le plasmide pB-SK, dont la transcription est sous le contrôle du promoteur du gène *lacZ* soumise à l'induction par l'IPTG.

La protéine A3B présente les régions illustrées sur les figures 3A et 3B. En NH<sub>2</sub>-terminal, on identifie un peptide hydrophobe, pouvant être clivé, qui est décrit dans la littérature comme un peptide signal de la voie sécrétion. On rencontre ensuite le domaine répété riche en leucine, au nombre de 6 répétitions pour le clone A3B. A une dizaine d'acides aminés de la fin de ce domaine se trouve une région riche en proline, thréonine et sérine, appelée ci-après région poly P/T/S. Cette région est suivie d'une région riche en cystéines, pouvant être impliquée dans des ponts disulfures. Enfin la séquence protéique se termine par un peptide signal hydrophobe.

Les ADNc des clones A3B et 2C1 présentent une homologie quasi totale et sont donc considérés comme identiques, l'ADNc du clone 2C1 correspondant à une partie tronquée en 5' de l'ADNc du clone A3B.

Le clone A3B, représentatif de cette famille, a fait l'objet d'un séquençage entier dans les deux sens.

On a rapporté sur la figure 2, les sites des enzymes de restriction pour chacun de ces clones Nt=nucléotides ; ATG=codon d'initiation ; TAG=codon stop.

L'analyse sur le banque de donnée PROSITE montre que la protéine A3B possède un site de N-glycosylation localisé à la fin de chaque domaine répété riche en leucine, et 12 sites potentiels de phosphorylations.

L'analyse de la localisation de cette protéine sur le serveur PSORT prédit une localisation cytoplasmique à 92%, ce qui indique que la protéine est soluble. Cette protéine est vraisemblablement ancrée à la surface par un Glycosyl Phosphatidyl Inositol ou GPI. Le peptide signal hydrophobe peut donc être clivé et permettre l'ancrage du GPI au niveau de l'asparagine (D).

Le poids moléculaire théorique de la protéine du clone A3B diffère d'environ 2,9 kDa avec celui des protéines 1A1 et W2, ce qui est en accord avec la différence de 2,5 kDa observée entre les protéines recombinantes correspondantes. Cette différence est due à la présence d'un nombre variable de répétitions riches en leucines ou LRR, chacune présentant aussi une composition en acides aminés particulière.



Les poids moléculaires apparents et théoriques des quatre types de PSA de l'invention sont rassemblés dans le tableau III suivant.

Tableau III

5

Type de PSA	P.M. de la protéine recombinante	P.M. théorique (non tronquée)	P.M. sans peptide signal (3,2 kDa)
4 LRR (2G1)	/	33,5 kDa	30,3 kDa
6 LRR (A3B)	42,5 kDa	38,5 kDa	35,3 kDa
7 LRR (1A1 et W2)	45 kDa	41,4 kDa	38,2 kDa

## 2 - Obtention de parasites génétiquement modifiés :

Le clonage directionnel du gène LaPSA 38s dans le vecteur d'expression pTex a permis d'obtenir une construction capable d'exprimer le gène PSA en position sens.

10 Le plasmide pTex-LaPSA 38s orientation sens et le vecteur pTex vide ont ensuite été électroporés dans la souche sauvage *Leishmania infantum* Mon 1 Clone 1, puis les parasites ont été sélectionnés par la génétycine.

L'étude a été réalisée sur des parasites de l'espèce *L. infantum* sauvages (Sau), ceux transfectés par le pTex vide (pTex) et ceux transfectés par le pTex contenant la  
15 séquence nucléotidique d'intérêt (Sens).

### Caractérisation moléculaire :

L'analyse de l'ADN total par southern blot montre que la construction sens est stable et amplifiée chez la souche transformée. Les résultats sont illustrés sur la figure 4 qui donne les analyses des transcrits par RT-PCR chez les deux formes, promastigotes (P)  
20 et amastigotes (A). La figure 5 donne le niveau de production de la protéine par western-blotting, à l'aide d'un anticorps anti-PSA (figure 5A : protéines constitutives ; figure 5B : protéines excrétées / sécrétées)

### Caractérisation phénotypique des mutants :

La comparaison des cinétiques de croissance entre Ldi WT, Ldi pTex et Ldi Sens  
25 montre que la surexpression de LaPSA 38s n'interfère pas avec la croissance des

parasites. Seule une phase de latence plus longue est observée pour les souches transformées par rapport à la souche sauvage.

La sensibilité à la lyse par le complément humain a également été étudiée. Récemment, il a été démontré que la PSA de *L. amazoniensis* avait la propriété d'inhiber l'action du complément *in vitro*. Les promastigotes "sens" sont plus sensibles au complément. L'excès de PSA à la surface des parasites peut ainsi entraîner un clivage ainsi qu'une formation de complexes plus importante engendrant une lyse accrue.

#### Etude de pouvoir infectieux des parasites.

10 Pour étudier l'effet de la surexpression de LaPSA 38s sur le pouvoir infectieux des parasites, la première approche a consisté à mettre en contact des promastigotes des souches transformées avec des macrophages de chien, qui est le réservoir domestique naturel de la *leishmaniose* viscérale.

15 Les figures 6A et 6B donnent les résultats obtenus, respectivement, 2 h après contact avec les promastigotes et 48 h après contact avec les amastigotes sur ces figures, l'index parasitaire correspond au % de macrophages infectés par la souche Sens x le nombre de parasites par macrophage / % de macrophages infectés par la souche témoin (pTex) x le nombre de parasites par macrophage.

20 Les promastigotes surexprimant LaPSA 38s, présentent un pouvoir infectieux 2 fois plus important vis-à-vis des macrophages canins. De plus, après phagocytose, les amastigotes exprimant le transgène possèdent une capacité à survivre et à se multiplier dans la vacuole parasitophore significativement supérieure (2,5 à 5 fois) à celle du témoin transfecté par le vecteur vide.

## REVENDEICATIONS

- 5 1. Constructions d'acides nucléiques, caractérisées en ce qu'elles comportent des acides nucléiques isolés en position sens, capables de coder pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania*, lesdits acides nucléiques répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.
- 10 2. Constructions selon la revendication 1, caractérisées en ce que les séquences d'acides nucléiques sont des séquences de clones d'ADNc appartenant à une famille répondant aux caractéristiques illustrées par la figure 2 et comprenant en particulier un site de restriction *Sall* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.
- 15 3. Constructions selon la revendication 2, caractérisées en ce que lesdites séquences d'acides nucléiques comportent un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *Sall* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *Sall*.
- 20 4. Constructions selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que lesdites séquences d'acides nucléiques sont clonées en position sens dans un plasmide, tel que pTex.
- 25 5. Souches de *Leishmania* génétiquement modifiées, caractérisées en ce qu'elles correspondent à des formes amastigotes ou promastigotes de *Leishmania* transfectées par une construction selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.
6. Souches selon la revendication 5, caractérisées en ce qu'il s'agit de souches de *L.infantum*.
- 30 7. Procédé de transfection d'un parasite de *Leishmania*, caractérisé en ce qu'on introduit dans le parasite de *Leishmania* une construction selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comportant un marqueur, on sélectionne les parasites transfectés grâce audit marqueur, on les met en culture dans un milieu axénique et asérique totalement défini et on récupère le surnageant de culture qui renferme les protéines immunogènes présentes dans des

## REVENDICATIONS

1. Constructions d'acides nucléiques, caractérisées en ce qu'elles comportent des acides nucléiques isolés en position sens, capables de coder pour une protéine immunogène de formes promastigotes ou de formes amastigotes de *Leishmania*, lesdits acides nucléiques répondant à l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5.
2. Constructions selon la revendication 1, caractérisées en ce que les séquences d'acides nucléiques sont des séquences de clones d'ADNc comprenant en particulier un site de restriction *Sall* et deux sites de restriction *HindIII*, avec un codon stop situé en aval du premier site *HindIII*.
3. Constructions selon la revendication 2, caractérisées en ce que lesdites séquences d'acides nucléiques comportent un site de restriction *EcoRV* et/ou *PstI* entre les deux sites *Sall* et *HindIII*, ou de part et d'autre du site *Sall*.
4. Constructions selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que lesdites séquences d'acides nucléiques sont clonées en position sens dans un plasmide, tel que pTex.
5. Souches de *Leishmania* génétiquement modifiées, caractérisées en ce qu'elles correspondent à des formes amastigotes ou promastigotes de *Leishmania* transfectées par une construction selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.
6. Souches selon la revendication 5, caractérisées en ce qu'il s'agit de souches de *L.infantum*.
7. Procédé de transfection d'un parasite de *Leishmania*, caractérisé en ce qu'on introduit dans le parasite de *Leishmania* une construction selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comportant un marqueur, on sélectionne les parasites transfectés grâce audit marqueur, on les met en culture dans un milieu axénique et aséptique totalement défini et on récupère le surnageant de culture qui renferme les protéines immunogènes présentes dans des

concentrations de l'ordre de 10 à 20 fois supérieures à celle produite par la souche mère de *Leishmanie*.

concentrations de l'ordre de 10 à 20 fois supérieures à celle produite par la souche mère de *Leishmanie*.



```

A3B  GTGCCGTAAGGACATGTATATATGTATGIGTATGTATATGAGTATGTATATATGTACGGTTATATATAGGAATTGTGT
2C1  GTGCCCTTAAGGACATGTATATGTATGTATGTATATGAGTATGTATATATGTACGGTTATATATAGGAATTGTGT
1A1  GTGCATGTAAAGGACATGTATATGTATGTATGTATGTATATGAGTATGTATATATGTACGGTTATATATAGGAATTGTGT
2G1  GTGCCATTAAGGACATGTATATGTATGTATGTATGTATATGAGTATGTATATATGTACGGTTATATATAGGAATTGTGT
W2   GTGCCCTTAAGGACATGTATATGTATGTATGTATGTATATGAGTATGTATATATGTACGGTTATATATAGGAATTGTGT

A3B  ATGTTGAGGTGTATGCAATGTGCGTGGCTATATTAGTGTGCGGAGCAGCGGTGTGCGGCAAGCTCTGCTGCGCGCTCC
2C1  XGTTGAGGTGTATGCAATGTGCGTGGCTATATTAGTGTGCGGAGCAGCGGTGTGCGGCAAGCTCTGCTGCGCGCTCC
1A1  ATGTTGAGGTGTATGCAATGTGCGTGGCTATATTAGTGTGCGGAGCAGCGGTGTGCGGCAAGCTCTGCTGCGCGCTCC
2G1  ATGTTGAGGTGTATGCAATGTGCGTGGCTATATTAGTGTGCGGAGCAGCGGTGTGCGGCAAGCTCTGCTGCGCGCTCC
W2   ATGTTGAGGTGTATGCAATGTGCGTGGCTATATTAGTGTGCGGAGCAGCGGTGTGCGGCAAGCTCTGCTGCGCGCTCC

A3B  GCTGTGCGGTGTACCTGCTGTGCGCGCGGTGGCGGGTGGCGCGGGTGGTGGCGGTGGCGCGGGCGGGGGCTCCCTGTGT
2C1  GGTGTGCGGTGTACCTGCTGTGCGCGCGGTGGCGGGTGGCGGGTGGTGGCGGTGGCGCGGGCGGGGGCTCCCTGTGT
1A1  GCTGTGCGGTGTACCTGCTGTGCGCGCGGTGGCGGGTGGCGGGTGGTGGCGGTGGCGCGGGCGGGGGCTCCCTGTGT
2G1  GCTGTGCGGTGTACCTGCTGTGCGCGCGGTGGCGGGTGGCGGGTGGTGGCGGTGGCGCGGGCGGGGGCTCCCTGTGT
W2   GCTGTGCGGTGTACCTGCTGTGCGCGCGGTGGCGGGTGGCGGGTGGTGGCGGTGGCGCGGGCGGGGGCTCCCTGTGT

A3B  TTTCCTATTTCCTGTTCCCTGTTGACCTCAAGAAAAAATAAAAAAAAAA
2C1  TTTCCTATTTCCTGTTCCCTGTTGACCTCAAGAAAAAATAAAAAAAAAA
1A1  TTTCCTATTTCCTGTTCCCTGTTGACCTCAAGAAAAAATAAAAAAAAAA
2G1  TTTCCTATTTCCTGTTCCCTGTTGACCTCAAGAAAAAATAAAAAAAAAA
W2   TTTCCTATTTCCTGTTCCCTGTTGACCTCAAGAAAAAATAAAAAAAAAA

```

FIGURE 1 (Suite)

Alignement en 3' des séquences nucléotidiques des différents clones ADNc

```

SEQ ID N°1  A3B
SEQ ID N°2  2C1
SEQ ID N°3  1A1
SEQ ID N°4  2G1
SEQ ID N°5  W2

```



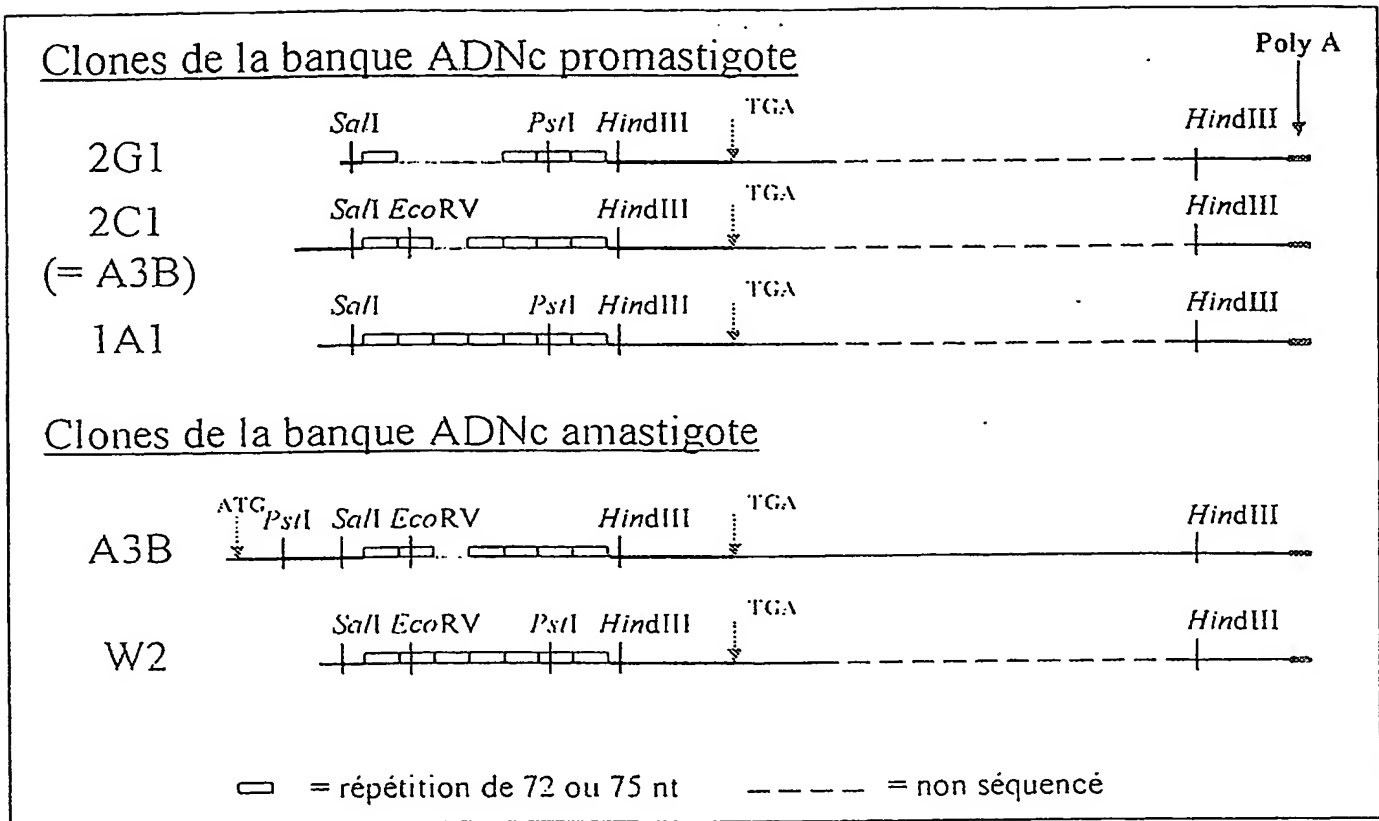


FIGURE 2

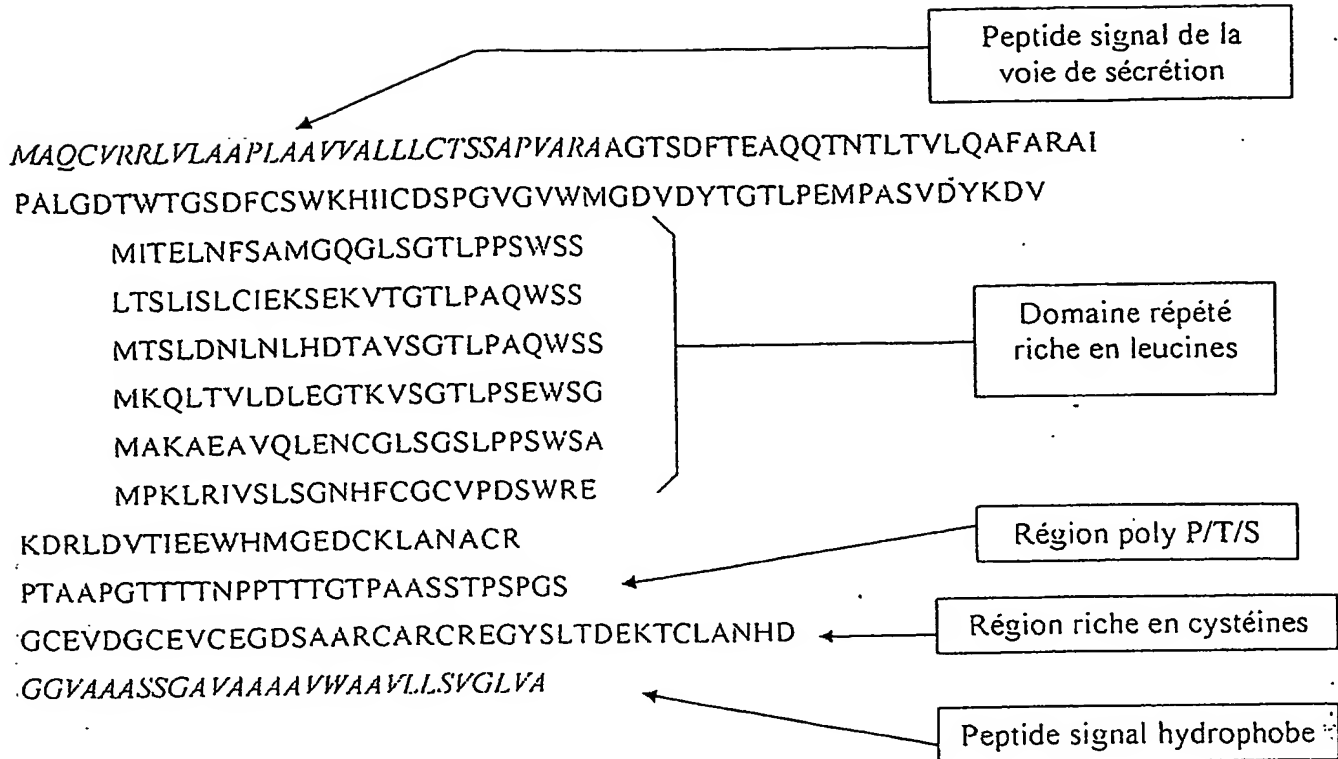


FIGURE 3A

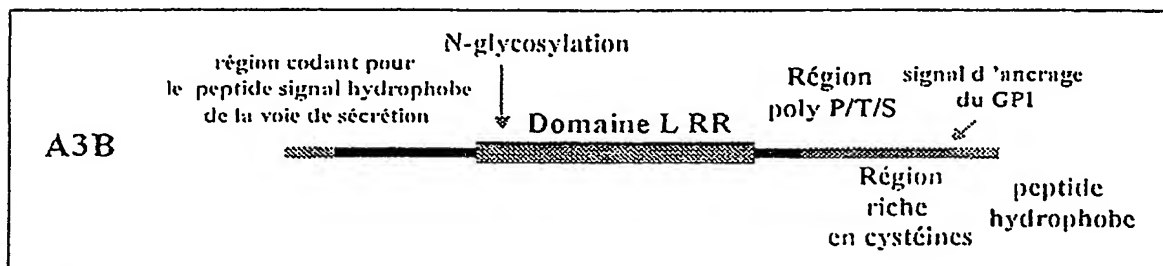
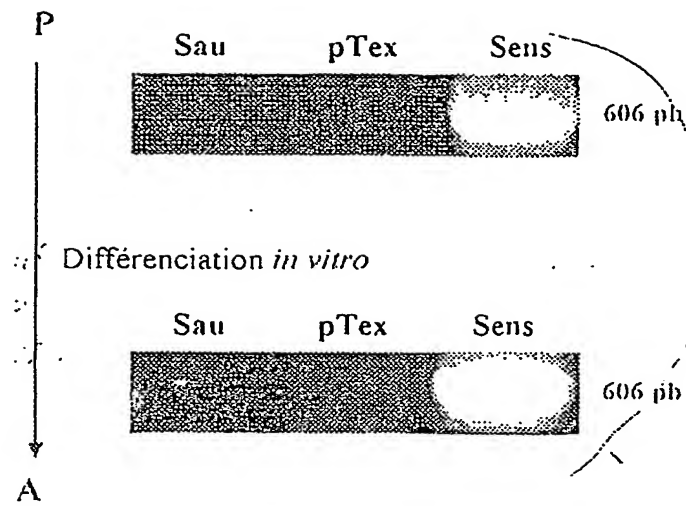
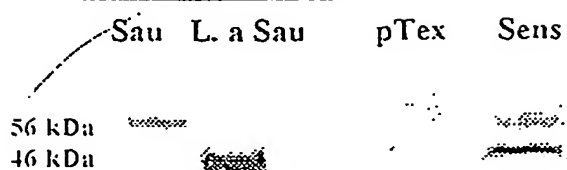


FIGURE 3B

FIGURE 4

-Protéines constitutives

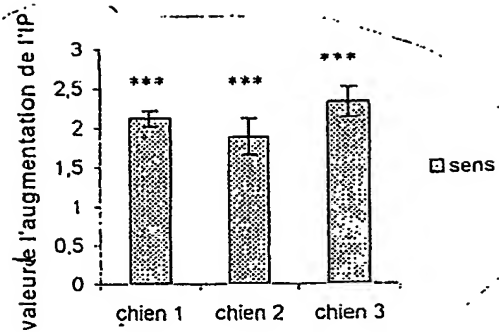
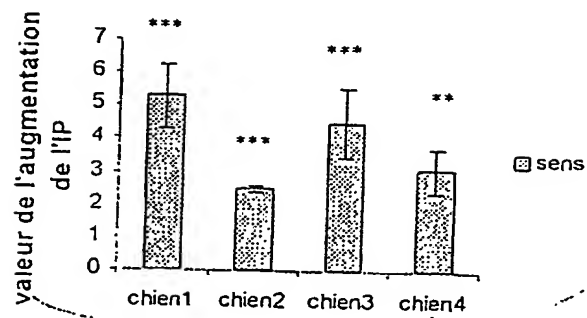
10  $\mu$ g par piste ; *L. a* : *Leishmania amazonensis*.

-Protéines excrétées/sécrétées

Sau pTex      Sens      L. a Sau

10 $\mu$ l    10 $\mu$ l    10 $\mu$ l    5 $\mu$ l    2 $\mu$ l    2 $\mu$ l    5 $\mu$ l    10 $\mu$ l

**FIGURE 5**

**FIGURE 6A****FIGURE 6B**

## SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT DE LA RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD)

<120> NOUVEAUX MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES

<130> CP/BB 61158-1820

<140> FR 03 13 555

<141> 2003-12-19

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2526

<212> DNA

<213> Leishmania amazonensis

<400> 1

gaaccctgtt gcgaatggcg cagtgcgtgc gtcggctggt gctggcggcg cccctcgccg  
60

ctgtggtggc gctgctgctg tgcacgagca gtgcaccggt ggcgctgct gcggggaaga  
120

gcgacttcac tgaggcgag cagacgaaca cgctgacggt gctgcaggcg tttgcgctg  
180

cgatccctgc gcttggggac acgtggacgg gcagcgactt ctgctcgtgg aagcacatca  
240

tctgcgactc ccccgcgctc ggctgtgga tggcgatgt ggattatacc ggcacgctgc  
300

cggagatgcc tgcgagcgtc gactacaagg acgtcatgat cacggaactg aacttcagcg  
360

caatgggcca ggggctgagc gggacgctgc cccctcatg gagctcgtg acgtccttga  
420

tatcactgtg catcgaaaag tctgagaagg tcaaccggcac gctgcctgcc cagtggagct  
480

cgatgacgtc gctggacaac cttaacctgc acgacacggc ggtctccggc acgtgcctg  
540

cccagtgag ctcgatgaag cagctgaccg ttctggatct ggagggcact aaggtgtccg  
600

gcacgctgcc gtccgagtgg agtgggatgg cgaaggccga ggccgtgcag ctggagaact  
660

gcggtctgtc cgggagtctg cccctcgt ggtctgcgat gccgaagctg cgtatcgtct  
720

actgagcgg caaccacttc tgcgggtgcg tgcccgaact gtggagggag aaggaccgcc  
780

tcgatgtgac catcgaggaa tggcacatgg gcgaggactg caagcttgct aacgcctgcc  
840

gcccgaactgc tgctccggga acgaccacga ctaaccgcc caccaccacc ggcacccag

900

cagcctcctc tactccttct ccagggtcgg ggtgcgaggt ggatgggtgt gaggtgtgcg  
960

agggggactc cgctgcgcgg tgcgccaggt gccgtgaggg ctactccctg acggacgaga  
1020

agacgtgcct ggccaaccac gatggcgggc tggcgggcggc gtcgagcgga gcggtggctg  
1080

ccgtgtctgt gtgggcggct gtgctgttga gcgtggggct ggtggcgtga ggggtgcggc  
1140

ggcacacgcg cagcgcaca cgccgtcgtg catcgcgtgt gctttccgcc gttgtggcgc  
1200

ctgcacggat gcacgggcat gcggaggcgt gcatgcgtgt gcgcgtgcca gctcttgtgt  
1260

gtctctccgt gtggccagca gtcggcacc cgcgccatcg aatgtgcgcg cggcggcggt  
1320

gtgtgcctt ggacagcgga tgcgggcgcc cgccctcgc cgtgtgcct gcggtctgct  
1380

gtgtgccgc gcgagcgaeg tacggatgcg ctgtccggcc ctcttcgaag gggctcgctt  
1440

gcggtgctgt gctctcgtgg tctgtgccgg tgcgtccctg gcggggtgag agctggcggg  
1500

ggcgtgggtg cgcgcgcggc agctctccgc tgcgttgagg gcggcctgcc cctgcgtccg  
1560

cgcacgicg cgctctcctc gacgccactg cgcgcgcttg ttggcttgct ttgctctgtc  
1620

gtgcgcactc tctcttattt tccgtttcat tcgcctgtat tctcttctcc caccgcactg  
1680

cggcctcgtc accgcggccg tgcggtgcgc aggcgggtga tgtgccgttg tgccccct  
1740

ttcatggcg cgtgggpcga tcgccctctt gcctccctcc tccccctccc cctccgcgcg  
1800

gtcctgtcaa ttgtatatcc gtggacctta tcttcgtact gcctccgcgc ctcttcgta  
1860

aagcttcgtt ggcgtgtgcc gceccccgga cgtcagcgcc gctgtgctcg catgctcacg  
1920

gtgcgtcccc gtgcgtgggc gtgcacgtaa ggacatgtat atatgtatgt gtatgtatat  
1980

gagtatgtat atatgtacgg ttatatatag gaatttgtgt atgttgaggt gtatgcatgt  
2040

gcgtgcgtat attagtgtgt gcgagcacgc gtgttgccgc acgctctgct gcccgctcc  
2100

gctgtgcgtg tactcgcgtg tgggcgcggg ggcgggtggc gccgggtggg ggccgtgcgg  
2160

cgggcggggg ctctctgtg tttctctatt tctctgttcc ctgttgacct caaaaaaaaa  
2220

aaaaaaaaaa aaagtgcacg taaggacatg tatatatgta tgtgtatgta tatgagtatg  
2280

tatatatgta cggttatata taggaatttg tgtatgttga ggtgtatgca tgtgcgtgcg  
2340

tatattagtg tgtgcgagca cgcgtgttgc gccacgctct gctgcccgcc tccgctgtgc  
2400

gtgtcactcg ctgtgggcgc ggtggcgggt ggcgccgggt ggtggccgtg cggcgggcgg  
2460

gggtcctct gtgtttctct atttctctgt tccctgttga cctcaaaaaa aaaaaaaaaa  
2520

aaaaaa  
2526

<210> 2

<211> 1401

<212> DNA

<213> Leishmania amazonensis

<400> 2

cgtaggacggg cagcgacttc tgctcgtgga agcacatcat ctgcgactcc cccggcgctcg  
60

gcgtgtggat gggcgatgtg gattataccg gcacgctgcc ggagatgcct gcgagcgctg  
120

actacaagga cgtcatgatc acggaactga acttcagcgc aatgggccag gggctgagcg  
180

ggacgctgcc cccctcatgg agctcgctga cgtccttgat atcactgtgc atcgaaaagt  
240

ctgagaaggt caccggcacg ctgcctgccc agtggagctc gatgacgtcg ctggacaacc  
300

ttaacctgca cgacacggcg gtctccggca cgctgcctgc ccagtggagc tcgatgaagc  
360

agctgaccgt tctggatctg gagggcacta aggtgtccgg cacgctgccg tccgagtgga  
420

gtgggatggc gaaggccgag gccgtgcagc tggagaactg cggctctgtcc gggagtctgc  
480

ccccctcgtg gtctgcgatg ccgaagctgc gtatcgtctc actgagcggc aaccacttct  
540

gcgggtgcgt gcccgactcg tggagggaga aggaccgcct cgatgtgacc atcgaggaat  
600

ggcacatggg cgaggactgc aagcttgcta acgcctgccg cccgactgct gctccgggaa  
660

cgaccacgac taaccgccc accaccaccg gcacccagc agcctcctct actccttctc  
720



cagggtcggg gtgcgaggtg gatgggtgtg aggtgtgcga gggggactcc gctgcgcggt  
780

gcgccaggtg ccgtgagggc tactccctga cggacgagaa gacgtgcgtg gcgaaccacg  
840

atggcggcgt ggcggcggcg tcgagcggag cggatggctgc cgctgctgtg tgggcggctg  
900

tgctgttgag cgtggggctg gtggcgtgag ggtgcggcgg gccctcttc tctgtggtgc  
960

ccctggtgcc tgccctcgcc cccggcacgg cgtcgtcgt gccctcttc acccccacca  
1020

gccgacgggg agaccgacag ccacacgcgc acgcgcacac gccgtcgtgc atcgcgtgtg  
1080

cgtgcactta aggacatgta tataatgtatg tgtatgtata tgagtatgta tataatgtccg  
1140

gttatatata ggaatttgtg tatgttgagg tgtatgcatg tgcgtgcgta tattagtctg  
1200

tgcgagcacg cgtgttgccg cacgctttgc tgcccgcctc cgctgtgcgt gtccctccct  
1260

gtgggcgcgc tgccgggtgg ccccggtgg tgccgtgcg gcgggcgggg gctcctctgt  
1320

gtttctctat ttctctgttc cctgttgacc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa  
1380

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a  
1401

<210> 3

<211> 1684

<212> DNA

<213> *Leishmania amazonensis*

<400> 3

ggacgggcag cgacttctgc tcgtggaagc acatcatctg cgactcccc ggcgctggcg  
60

tgtggatggg cgatgtggat tataccggca cgctgccgga gatgcctgcg agcgctgact  
120

acaaggacgt catgatcatg gcactggact tcggcgcaat gggccaggga ctgagcggga  
180

cgctgcccc ctcattggagc tcgctgacgt ccttgatgtc actgtggatc gaaaagtctg  
240

agaaggtcac cggcacgctg cctaccagc ggagctcgat gaagcagctg acccttctgc  
300

atctgaaggg cactaagggtg tccggcacgc tgccgccga gtggagtggg atgacgtcgc  
360

tggacgacct taacctgcac gacacggcgg tctccggcac gctgcctgcc cagtggagct  
420

cgatgaagca gctgatcgat ctggatctgg agggcactaa ggtgtccggc acgctgccgc  
 480  
 ccgagtggag tgggatggcg aaggccgagg ccctgcagct gaagtactgc gatctgtccg  
 540  
 ggagtctgcc cccctcgtgg tcttcgatgc agaagctgcg tatcgtctca ctgagcggca  
 600  
 accacttctg cgggtgcgtg cccgactcgt ggagggagaa ggaccgcctc gatgtgacca  
 660  
 tcgaggaatg gcacatgggc gaggactgca agcttgctaa cgctgccgc ccgactgctg  
 720  
 ctccgggaac gaccacgact aaccgcccc ccaccaccgg caccocagca gcctcctcta  
 780  
 ctcttctcc agggtcgggg tgcgaggtgg atgggtgtga ggtgtgcgag ggggactccg  
 840  
 ctgcgcggtg cgccagggtg cgtgagggct actccctgac ggacgagaag acgtgcctgg  
 900  
 cgaaccacga tggcggcgtg gcggcggcgt cgagcggagc ggtggctgcg gctgctgtgt  
 960  
 gggcggctgt gctgttgagc gtggggctgg tggcgtgagg gtgcggcggc cccctcttct  
 1020  
 ctgtggtgcc cctggtgcct gccctcgccc ccagcacggc gtcgtcgtg cctctcacc  
 1080  
 cccaccagcc gaaggggaga ccgacagcca cacgcacacg cgcacgcgcc gtcgtgcatc  
 1140  
 gcgtgtgctt tccgcggtt tggcgcctgc gcggatgcac gggcatgcgg aggcgtgcat  
 1200  
 gcgtgtgcgc gtgccagctc ttgtgtgtct ctccgtgtgg ccagcagtcg gcaccgcgc  
 1260  
 cgatcgaatg tgcgcgcggc ggcggtgtgt cgccttgac agcggatgcg gcgcccgcc  
 1320  
 ctgcgcgtgt gccctgcggt ctgctgtgct gccgcgcgag cgacgtacgg agtgcattga  
 1380  
 aggacatgta tatatgtatg tgtaggtata tgagtatgta tatatgtacg gttatatata  
 1440  
 ggaatttgtg tatgttgagg tgtatgcatg tgctgctgta tattagtctg tgcgagcacg  
 1500  
 cgtgttgcc caccgtttgc tggccgcctc tgctgtgct gtcactccct gtgggcgcgc  
 1560  
 tggcgggtgg cgccgggtgg tggcgtgct gcgggcgggg gctcctctgt gtttctctat  
 1620  
 ttctctgttc cctgttgacc tcaagaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa  
 1680

aaaa  
1684

<210> 4  
<211> 1404  
<212> DNA  
<213> *Leishmania amazonensis*

<400> 4  
tcggcgtgtg gatgggcatg gtggattata ccggcacgct gccggagatg cctgcgagcg  
60

tcgactacaa ggacgtcatg atcacggaac tgaacttcgg cgcaatgggc cagggactga  
120

gcgggacgct gccccctca tggagctoga tgaagcagct gatcgatctg gatctggagg  
180

gcactaaggt gtccggcacg ctgccgccc agtggagtgg gatggcgaag gccgaggccc  
240

tgcagctgaa gtactgcatg ctgtccggga gtctgcccc ctcgtggtct tcgatgcaga  
300

agctgcgtat cgtctcactg agcggcaacc acttctgcgg gtgcgtgccc gactcgtgga  
360

gggagaagga ccgcctcgat gtgaccatcg aggaatggca catgggagcg gactgcaagc  
420

ttgctaacgc ctgccgccc actgctgctc cggaacgac cagactaac ccgccacca  
480

ccaccggcac ccagcagcc tcctctactc cttctccagg gtccgggtgc gaggtggatg  
540

ggtgtgaggt gtgcgagggg gactccgctg cgcggtgcgc caggtgccgt gagggctact  
600

ccctgacgga cgagaagacg tgccctggcga accacgatgg cggcgtggcg gcggcgtcaa  
660

gcggagcggg ggctgcggct gctgtgtggg cggctgtgct gttgagcgtg gggctggtgg  
720

cgtgaggggt cggcgggccc ctcttctctg tgggtccccct ggtgcctgcc ctcgcccccg  
780

gcacggcgtc gtgcgtgccc tctctcacc ccaccagccg acggggagac cgacagccac  
840

acgcgcacgc gcacacgccg tcgtgcatcg cgtgtgcttt ccgccgttgt gggcctgca  
900

cggatgcacg ggcattgcga ggcgtgcatg cgtgtgcgcg tgccagctct tgtgtgtctc  
960

tccgtgtggc cagcagtcgg caccgcgcc gatcgaatgt gcgcgcggcg gcggtgtgtc  
1020

gccttgaca gcggatgctg gcgccccccc ctcgcgtgtg cctcgggtctg cgtgtcgtgg  
1080

ccgcgcgagc gacgtacgga gtgcgctgtg tgcacttaag gacatgtata tatgtatgtg  
1140

tatgtatatg agtatgtata tatgtacggt tatatatagg aatttgtgta tgttgagggtg  
1200

tatgcatgtg cgtgcgtata ttagtctgtg cgagcacgcg tgttgcgcca cgctttgctg  
1260

cccgcctccg ctgtgggtgt cactcgctgt gggcccgggtg gcgggtggcc ccgggtgggtg  
1320

cccgttcggc gggcgggggc tcctctgtgt ttctctatct ctctgttccc tgttgccctc  
1380

caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa  
1404

<210> 5  
<211> 1501  
<212> DNA  
<213> Leishmania amazonensis

<400> 5  
ccggcgctcg cgtgtggatg ggcgatgtgg attataccgg cacgctgccg gagatgcctg  
60

cgagcgtcga ctacaaggac gtcgatgatca cggaactgaa cttcagcgca atgggccagg  
120

ggctgagcgg gacgctgccc ccctcatgga gctcgctgac gtccttgata tcaactgtgca  
180

tcgaaaagtc tgagaaggtc accggcacgc tgcctgcca gtggagctcg atgacgtcgc  
240

tggacaacct taacctgac gacacggcgg tctccggcac gctgccgccc gagtggagtg  
300

ggatgacgtc gctggacgac cttaacctgc acgacacggc ggtctccggc acgctgcctg  
360

cccagtggag ctcgatgaag cagctgatcg atctggatct ggagggcact aagggtgccg  
420

gcacgctgcc gcccgagtgg agtgggatgg cgaaggccga ggccctgcag ctgaagtact  
480

gcgatctgtc cgggagtctg cccccctcgt ggtcttcgat gcagaagctg cgtatcgtct  
540

cactgagcgg caaccacttc tgcgggtgcg tgcccgaactc gtggagggag aaggaccgcc  
600

tcgatgtgac catcgaggaa tggcacatgg gcgaggactg caagcttgct aacgcctgcc  
660

gcccgaactgc tgctccggga acgaccacga ctaaccgcc caccaccacc ggcaccccag  
720

cagcctcctc tactccttct ccagggtcgg ggtgcgaggt ggatgggtgt gaggtgtgcg  
780

agggggactc cgctgcgcgg tgcgccaggt gccgtgaggg ctactccctg acggacgaga  
840  
agacgtgcct ggcgaaccac gatggcgggc tggcggcggc gtcaagcgga gcggtggctg  
900  
cggctgctgt gtgggcggct gtgctgttga gcgtggggct ggtggcgtga gggcgccgcc  
960  
gccccctctt ctctgtggtg cccctgggtg ctgccctgc cccagcacg gggcgctgc  
1020  
tgccctctca cccccaccag ccgaagggga gaccgacag cacacgcaca cgcgcacgcg  
1080  
ccgtcgtgca tcgctgtgc tttccgccgt tgtggcgct gcgcggatgc acgggcatgc  
1140  
ggaggcgtgc atgcgtgtgc gcgtgccaac tcttgtgtgt ctctccgtgt ggccagcagt  
1200  
cggcaccgt gcacgtaagg acatgtatat atgtatgtgt aggtatatga gtatgtatat  
1260  
atgtacggtt atatatagga atttgtgtat gttgaggtgt atgcatgtgc gtgcgtatat  
1320  
tagtctgtgc gagcacgcgt gttgcgccac gctctgctgc ccgcctctgc tgtgcgtgtc  
1380  
actcgtgtg ggcgcgctgg cgggtggcgc cgggtgggtg ccgtgcggcg ggcgggggct  
1440  
cctctgtgtt tctctatttc tctgttcct gttgacctca agaaaaaaaa aaaaaaaaaa  
1500  
a  
1501

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1.../2...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 @ W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		CP 61158-1820
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0313555
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
"NOUVEAUX MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES"		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
INSTITUT DE LA RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD)		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	<b>Nom</b>	LEMESRE
	<b>Prénoms</b>	Jean-Loup
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	138, Avenue de Lodève Bât. 6, 1D
	<b>Code postal et ville</b>	3410710 MONTPELLIER
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		IRD
<b>2</b>	<b>Nom</b>	CAVALEYRA
	<b>Prénoms</b>	Mireille
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	53, Rue Copernic
	<b>Code postal et ville</b>	34101010 MONTPELLIER
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		IRD
<b>3</b>	<b>Nom</b>	SERENO
	<b>Prénoms</b>	Denis
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	12, Avenue de Sète
	<b>Code postal et ville</b>	3415610 POUSSAN
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		IRD
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)  Mandataire : Chantal PEAUCELLE 92-1189 Paris, le 19 novembre 2003		

*Chantal Peaucele*

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 © W / 270501

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		CP 61158-1820
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		03 13 555
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
"NOUVEAUX MOYENS POUR LA PREVENTION DES LEISHMANIOSES"		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
INSTITUT DE LA RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (IRD)		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	Nom	HOLZMULLER
	Prénoms	Philippe
Adresse	Rue	Grand Rue
	Code postal et ville	13 14 15 16 10 POUSSAN
Société d'appartenance (facultatif)		IRD
<b>2</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
Mandataire : Chantal PEAUCELLE 92-1189 Paris, le 19 novembre 2003		

BEST AVAILABLE COPY